动 物 学 研 究 2009，Apr. 30(2): 151−157 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2009.02151

黑鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的 SCGE 检测

叶 霆[1]，竺俊全[1,*]，杨万喜[2]，魏 平[1]，吴雄飞[3]

（1. 宁波大学 教育部应用海洋生物技术重点实验室，浙江 宁波 315211；2. 浙江大学 生命科学学院，浙江 杭州 310012；3. 宁波市海洋与渔业研究院，浙江 宁波 315012）

摘要：以 0.5mL 的麦细管为冻存管和 DMSO 为抗冻剂进行超低温冷冻黑鲷精子，对冻精核 DNA 的损伤情况进行单细胞凝胶电泳（SCGE）检测，其结果表明，以 Cortland 溶液为稀释液，5%、10%、15%及 20%DMSO 为抗冻剂的超低温冻存的黑鲷精子活力、受精率与鲜精无显著差异。其中以 10%DMSO 为抗冻剂的冻存效果最佳，冻精的激活率、运动时间、寿命及受精率分别达（92.91±1.25）%、（39.90±2.70）min、（53.82±2.84）min 及（89.35±1.99）%；而以 25%及 30%DMSO 为抗冻剂时，冻精活力及受精率显著下降。SCGE 检测结果显示，DMSO 浓度为 5%、10%、15%及 20%时，黑鲷冻精与鲜精的彗星率及损伤系数差异不显著；DMSO 浓度为 25%及 30%时，冻精与鲜精的彗星率及损伤系数差异显著；冻精的彗星率与抗冻剂 DMSO 浓度成正相关。黑鲷鲜精及冻精核的 DNA 损伤主要为轻度和中度损伤，重度损伤比例较低，完全损伤仅存在于 25%及 30%DMSO 为抗冻剂的冻精中，且比例低。分析认为，较高浓度的 DMSO 是引起冻精核 DNA 损伤的主要原因。

关键词：黑鲷；精子；超低温冻存；精子活力；受精率；DNA 损伤；单细胞凝胶电泳
中图分类号：Q959.483；Q492 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2009)02-0151-07

Sperm Cryopreservation in *Sparus macrocephalus* and DNA Damage Detection with SCGE

YE Ting[1], ZHU Jun-quan[1, *], YANG Wan-xi[2], WEI Pin[1], WU Xiong-fei[3]

(1. *Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology by the Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo* 315211, *China*; 2. *College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou* 310012, *China*; 3. *Ningbo Academy of Oceanology and Fisheries, Ningbo* 315012, *China*)

Abstract: In this paper, DMSO was used as cryoprotectant for cryopreservation of *Sparus macrocephalus* spermatozoa in 0.5 mL straws. Detection of DNA damage in response to a cryopreservation process in *Sparus macrocephalus* spermatozoa was also carried out. The results demonstrated that there were no significant differences between frozen-thawed sperm conserved by Cortland solution diluted with 5%, 10%, 15%, 20% DMSO and fresh sperm in motility. The best motility of frozen-thawed sperm were obtained when DMSO concentration was 10%, and the activation rate, moving time, living time and fertilization rate of frozen-thawed sperm were 92.91±1.25%, 39.90±2.70 min, 53.82±2.84 min and 89.35±1.99% respectively. However, a significant drop in sperm motility and fertilization rate was observed in sperm cryopreserved with 25% and 30% DMSO. The comet rate and damage coefficient of frozen-thawed sperm conserved with 5%, 10%, 15%, 20% DMSO was similar to fresh sperm, but at 25% and 30% were significantly differed to fresh sperm. In fact, there was a positive correlation between comet rate of frozen-thawed sperm and concentration of DMSO in protocol. The majority of sperm with DNA damage within the nucleus were slightly and mildly damaged, while minorities were heavily damaged. Few were totally damaged, and only occurred under the conditions of 25% and 30% DMSO. Our analysis suggests that high concentration of DMSO is the main factor that causes the DNA damage in frozen-thawed sperm nucleus.

Key words: *Sparus macrocephalus*; Spermatozoa; Cryopreservation; Sperm motility; Fertilization rate; DNA damage; SCGE

黑鲷（*Sparus macrocephalus*）是我国名贵的海产经济鱼类，东南沿海重要的养殖种。开展黑鲷精子超低温冻存研究，建立优质精子的超低温冻存库，对其种质资源的保护、养殖品种的改良具有重

收稿日期：2008-10-06；接受日期：2009-01-22
基金项目：宁波市科学技术局项目（2006C100044；2007A31004）；教育部创新团队项目（IRTO734）
*通讯作者（Corresponding author），E-mail: zhujunquan@nbu.edu.cn
第一作者简介：叶 霆（1984-）， 男， 硕士研究生， 从事水产动物遗传育种研究。 E-mail: nbytfun@163.com

要意义。有关黑鲷精子超低温冻存的研究已有报道（Hong et al，1997; Jiang et al，1999; Li et al，2001），但精子的冻存效果（如激活率、运动时间及受精率等）与鲜精有一定差距。迄今为止，黑鲷冻精核DNA 损伤研究尚未见报道。精子 DNA 损伤状况是衡量精子质量的重要依据之一。单细胞凝胶电泳（single-cell gel electrophoresis，SCGE）或称彗星试验（comet assay）是一种检测 DNA 损伤的经典方法。细胞通过裂解、DNA 解链等过程，经电泳使损伤的 DNA 从细胞核中溢出，朝阳极泳动，形成尾状带，即彗尾，未损伤的 DNA 部分保持球形，两者共同形成“彗星”。彗尾的长度代表 DNA 迁移距离，荧光染色后彗尾的荧光强度与 DNA 损伤度相关，由此可以检测单个细胞的 DNA 损伤。由于能在荧光显微镜下直接观察细胞DNA的损伤情况，且具有快速、简便及灵敏的特点，已被应用于人类精子（Lu et al，2002；Xu et al，2000）以及鱼类精子（Labbe et al，2001；Zilli et al，2003；Xu et al，2005）DNA 损伤检测中。

本研究以 Cortland（Wolf，1963）溶液为稀释液，DMSO 为抗冻剂，0.5mL 的麦细管为冻存管进行黑鲷精子的超低温冻存试验。测定了冻精与鲜精的活力（激活率、运动时间及寿命）与受精率，并用 SCGE 法检测了以 5%—30%DMSO 为抗冻剂的超低温冻存精子核 DNA 的损伤情况，旨在为黑鲷精子超低温冻存技术改进及冻精质量的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

性成熟的黑鲷亲鱼于 2008 年 4 月取自浙江省宁波市海洋与渔业研究院横码基地苗种场，鱼体重 1—2kg/尾，雄鱼 5 尾、雌鱼 3 尾，供采精、卵用。

1.2 方 法

1.2.1 精液的采集与稀释 将黑鲷雄鱼用鱼夹固定，用洁净的毛巾擦干生殖孔周围体表，轻压鱼腹，使精液自然流出，获得无尿、粪便及血污的精液，经镜检精子活力在 90%以上者用于试验。精液稀释液为Cortland溶液（NaCl 7.25 g/L，KCl 0.38 g/L，$CaCl_2$ 0.18g/L，$NaHCO_3$ 1.00g/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.23 g/L，$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.41 g/L，$C_6H_{12}O_6$ 1.00 g/L，pH=7.00），抗冻剂为DMSO。先将稀释液与DMSO按一定比例混合后放置于冰箱 （4℃）预冷，再将精液与上述混合物按 1∶3 比例混匀成精液-稀释液混合物，于 4℃平衡 10—15min。

1.2.2 冷冻与解冻 将平衡过的精液-稀释液混合物分装入体积为 0.5mL 的麦细管中（每支麦细管盛装约 0.4mL），平放在离液氮面 3—5cm 处 5—8min 后，投入液氮中保存。同一 DMSO 浓度重复保存 4—6 支。解冻时将麦细管从液氮中快速取出，放入 40℃水浴中摇动溶化。

1.2.3 鲜精与冻精的活力及受精率测定 按 Jiang et al（2000a）的方法测定鲜精与冻存 30d 后精子的活力（激活率、运动时间及寿命）。

精子的激活率是指精液与激活液（盐度 28 的过滤海水）混合后，于显微镜下观察运动精子的数量占全部精子数量的百分比；精子的运动时间指精子自激活开始至 90%的精子原地颤动为止的时间；精子的寿命指精子自激活开始至 90%的精子停止运动所经历的时间。实验重复 4 次。

采用干法授精，即将鲜精（约 5μL）和冻精（约 20μL）分别与卵（约 0.5mL）混匀，10min 后加过滤海水洗卵 2 次，受精卵置于 1000mL 烧杯中（盛过滤海水 800mL），于室温（21—24℃）、微充气条件下孵育。胚胎发育到原肠胚中期时测定受精率。实验重复 4 次。

1.2.4 鲜精与冻精DNA损伤的SCGE检测 步骤：①稀释，冻存 30d后解冻的精液用 4℃的PBS（pH=7.4）离心洗涤两次（2000r/min），每次 5min。鲜精及冻精均用PBS稀释至约 8×10^6个/mL，取 50μL稀精液与 350μL浓度为 1%的液态低融点琼脂糖凝胶（LMA）混匀于 5mL离心管中。精液最终浓度约 10^6个/mL。②裂解，加入裂解液（2.5mol/L NaCl，100mmol/L EDTA，10g/L肌氨酸钠，pH 10，临用前加 1%Triton X-100，10% DMSO），10℃下裂解 1 h。③消化，加入消化液（2.5mol/L NaCl，5mmol/L Tris，0.5g/L肌氨酸钠，pH 7.4，临用前加 0.5g/L蛋白酶K），55℃水浴 3h，将精子核蛋白及其他杂蛋白消化掉。④铺片，PBS洗涤 2 次，70℃水浴加热 3min，使LMA融化成液态，取 100μL加在普通载玻片上，加盖盖玻片 10℃下冷凝 10min。⑤解旋，将玻片在碱性电泳液（300mmol/L乙酸钠，100mmol/L Tris，HCl调节pH至 10.0）中浸泡 30min，使精核DNA双链解旋。⑥电泳，在电压 15V、电流 130mA 条件下电泳 60min。⑦中和，Tris-HCl（0.4mol/L，pH7.0）中和 15min。⑧染色，EB（50μg/mL）染色

10 min。⑨观察，Nikon 80i荧光显微镜于激发光波长 580nm下观察，随机观察 100 个精子核，并拍摄彗星图片。每组（同一抗冻剂浓度）做 4 个平行样。

统计学处理：①彗星图片的分析处理，采用 CometScore 1.5 软件分析处理，获得彗星全长、尾长及彗星拖尾中 DNA 的量占细胞总 DNA 的比例等参数。②彗星率与损伤系数计算，彗星率=（彗星细胞数目/总细胞数目）×100%；损伤系数=[（0 级损伤的细胞个数×0）+（Ⅰ级损伤的细胞个数×1）+（Ⅱ级损伤的细胞个数×2）+（Ⅲ级损伤的细胞个数×3）+（Ⅳ级损伤的细胞个数×4）]。

所有实验数据和组间单因素方差分析采用 SPSS 11.5 完成，以 $P = 0.05$ 为检验水准，统计结果以平均值与标准误差（$\bar{x}\pm s$）表示。

2　结　果

2.1　黑鲷冻精的活力及受精率

鲜精及超低温冻存 30 d 后的黑鲷精子的活力（激活率、运动时间及寿命）与受精率测定结果见表 1。由表 1 可见，D1—D4 组冻精的活力及受精率与对照组的鲜精相比差异不显著，其中 D2 组冻精的活力与受精率最高，接近鲜精水平。D5、D6 组冻精的活力及受精率与鲜精相比差异显著。统计分析表明，黑鲷冻精的受精率与激活率呈线性正相关（图 1）。

2.2　黑鲷冻精的 DNA 损伤

鲜精和 6 组冻精的 SCGE 检测结果显示，彗星全长和尾长随抗冻剂 DMSO 浓度的升高而增大，其中 D1—D4 组冻精的彗星全长及尾长与鲜精相比差异不显著，D5、D6 组冻精的彗星全长及尾长与鲜精相比差异显著（表 2）。

根据彗星拖尾中 DNA 的量占细胞总 DNA 的比例，将本研究的黑鲷鲜精及冻精的 DNA 损伤程度分为 5 级：0 级：<5%（DNA in tail），正常的非彗星样细胞，精子核完整（图 2：1）；Ⅰ级：5%—20%（DNA in tail），轻度损伤，精子核缩小，可见彗尾（图 2：2，3）；Ⅱ级：20%—40%（DNA in tail），中度损伤，精子核进一步缩小，彗尾明显延长（图 2：4，5）；Ⅲ级：40%—95%（DNA in tail），重度损伤，精子核明显缩小，彗尾较长、荧光信号强（图 2：6，7）；Ⅳ级：>95%（DNA in tail），完全损伤，精子核模糊或消失，彗尾长、荧光信号极强（图 2：8，9）。

按照上述 DNA 损伤的分级方法，通过 CometScore 1.5 软件对彗星图片的数据进行处理，得出鲜精与冻精的 DNA 损伤情况见表 3。由表 3

表 1　黑鲷鲜精及冻精的活力与受精率（n=400, $\bar{x}\pm s$）

Tab. 1　Motility and fertilization rate of fresh sperm and frozen-thawed sperm (n=400, $\bar{x}\pm s$)

组别 Group	激活率 Activation rate (%)	运动时间 Moving time (min)	寿命 Living time (min)	受精率 Fertilization rate (%)
鲜精	94.21±3.03	42.32±4.23	55.61±4.76	91.16±2.92
D1	89.72±1.54	36.23±3.55	50.63±3.95	85.77±4.27
D2	92.91±1.25	39.90±2.70	53.82±2.84	89.35±1.99
D3	88.61±2.05	35.84±3.54	48.53±2.23	87.56±4.86
D4	86.49±1.69	33.85±2.20	45.51±4.26	85.64±3.94
D5	77.44±6.16*	24.46±3.24*	36.69±4.34*	71.61±2.88*
D6	66.15±5.34*	20.16±4.16*	27.34±6.35*	63.12±10.26*

D1: 5%DMSO；D2: 10%DMSO；D3: 15%DMSO；D4: 20%DMSO；D5: 25% DMSO；D6: 30%DMSO.

* P<0.05，与鲜精相比，差异显著（one-way ANOVA）。Significant effect of the treatment, P<0.05.

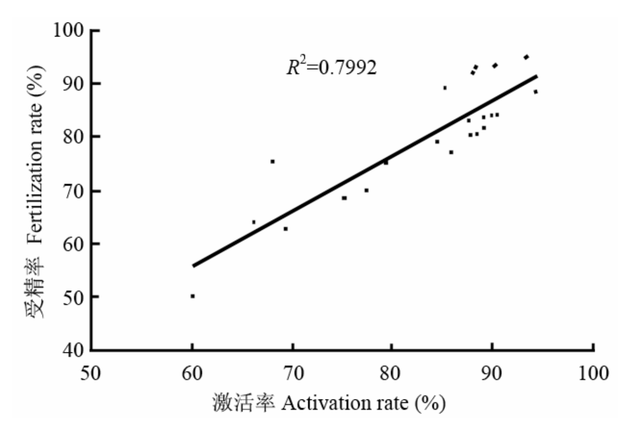


图 1 黑鲷冻精的受精率与激活率的相关性

Fig. 1　Relativity between fertilization rate and activation rate of frozen-thawed sperm

表 2 黑鲷鲜精及冻精的SCGE彗星全长及尾长（n=400, $\bar{x}\pm s$）

Tab. 2 Comet length and tail length of fresh sperm and frozen-thawed sperm (n=400, $\bar{x}\pm s$)

组别 Group	全长 Comet length (μm)	尾长 Tail length (μm)
鲜精	17.72±2.33	0.91±0.43
D1	22.70±4.08	1.06±0.44
D2	24.45±2.57	4.60±3.09
D3	25.22±4.23	4.93±2.86
D4	26.89±1.24	5.09±1.83
D5	34.77±2.37*	8.29±2.70*
D6	40.00±10.96*	10.30±2.08*

D1: 5%DMSO; D2: 10%DMSO; D3: 15%DMSO; D4: 20%DMSO; D5: 25%DMSO; D6:30%DMSO. *P<0.05，与鲜精相比，差异显著（one-way ANOVA）。*Significant effect of the treatment, P<0.05。

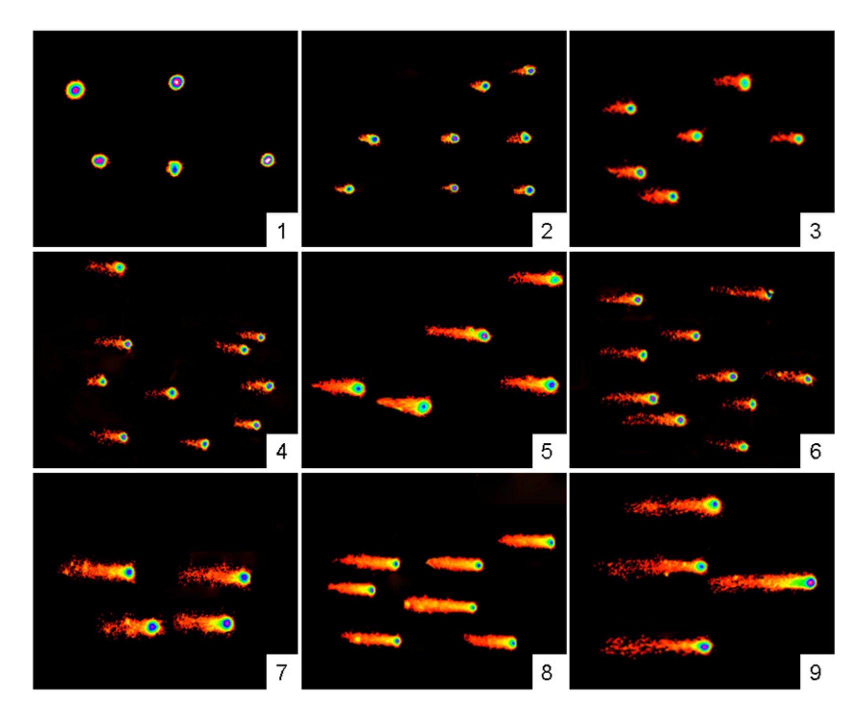


图 2 黑鲷鲜精及冻精的 SCGE 彗星图

Fig. 2 Comet image of fresh sperm and frozen-thawed sperm

1: 0 级损伤（grade 0 damage）×2000; 2: Ⅰ级损伤（grade Ⅰ damage）×1000; 3: 图 2 放大（enlarged drawing of picture 2）×1500; 4: Ⅱ级损伤（grade Ⅱ damage）×1000; 5: 图 4 放大（enlarged drawing of picture 4）×1800; 6: Ⅲ级损伤（grade Ⅲ damage）×1000; 7: 图 6 放大（enlarged drawing of picture 6）×1800; 8: Ⅳ级损伤（grade Ⅳ damage）×1000; 9: 图 8 放大（enlarged drawing of picture 8）×1800。

表 3 黑鲷鲜精及冻精SCGE检测的DNA损伤分级（n=400, $\bar{x}\pm s$）

Tab. 3 Classification of DNA damage detection of comet rate in fresh sperm and frozen-thawed sperm

组别 Group	0 级 Grade 0(%)	Ⅰ级 Grade Ⅰ (%)	Ⅱ级 Grade Ⅱ (%)	Ⅲ级 Grade Ⅲ (%)	Ⅳ级 Grade Ⅳ (%)	彗星率 Comet rate (%)	损伤系数 Damage coefficient
鲜精	79.12±4.65	13.25±3.3	6.43±1.29	0.84±0.50	0.00±0.00	20.14±4.65	27.47±6.35
D1	75.22±4.76	16.34±4.12	7.11±1.29	1.29±0.82	0.00±0.00	25.45±4.76	34.79±5.07
D2	74.54±2.94	16.96±4.65	6.85±3.11	2.35±2.22	0.00±0.00	26.62±2.94	38.29±5.10
D3	72.73±5.32	18.12±8.37	7.46±2.65	1.46±1.71	0.00±0.00	27.27±5.32	38.43±4.35
D4	71.14±3.30	18.76±4.04	7.52±1.71	2.94±0.82	0.00±0.00	28.64±3.3	40.71±4.24
D5	47.19±3.86*	25.16±2.06*	14.97±0.96*	11.42±3.51*	1.24±0.50	52.81±3.86*	94.95±11.87*
D6	30.88±2.99*	27.55±3.11*	21.38±2.75*	16.18±2.63*	3.75±2.22*	69.39±2.99*	134.34±7.27*

D1: 5%DMSO; D2: 10%DMSO; D3: 15%DMSO; D4: 20%DMSO; D5: 25%DMSO; D6: 30%DMSO.

* P<0.05，与鲜精相比，差异显著（one-way ANOVA）。*Significant effect of the treatment, P<0.05.

可见，D1—D4 组冻精与对照组的鲜精的各级损伤程度、彗星率及损伤系数均无显著差异。在 0 级损伤、Ⅰ级损伤、Ⅱ级损伤、Ⅲ级损伤、彗星率以及损伤系数等指标中，D5、D6 组冻精均与鲜精有显著差异（P＜0.05），而在Ⅳ级损伤指标中，仅 D6 组冻精与鲜精有显著差异（P＜0.05）。

对鲜精和 6 组冻精的彗星率及损伤系数的关系进行统计分析，绘制曲线图（图 3）。由图 3 可见，当 DMSO 浓度为 5%、10%、15%、20%时，冻精彗星率和损伤系数相对较低，与鲜精接近；而当 DMSO 浓度为 25%、30%时，冻精彗星率和损伤系数明显增大（P<0.05）。

对鲜精和 6 组冻精的彗星率与抗冻剂 DMSO 的浓度的相关性进行统计分析，结果表明，彗星率与 DMSO 的浓度成正相关（图 4）。

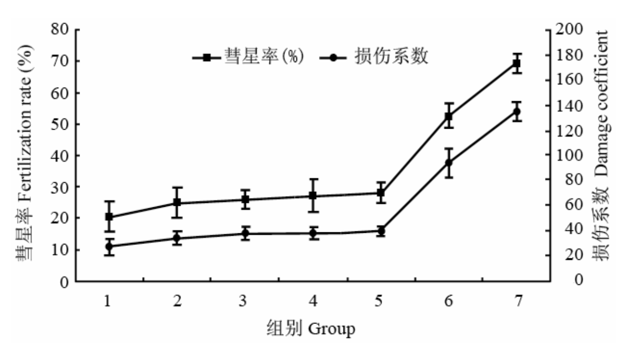


图 3　黑鲷鲜精及冻精 SCGE 检测的彗星率及损伤系数

Fig. 3　Comet rate and damage coefficient of fresh sperm and frozen-thawed sperm conserved with different DMSO concentration

1 组：鲜精; 2 组: 5% DMSO; 3 组: 10% DMSO; 4 组: 15% DMSO; 5 组: 20% DMSO; 6 组: 25% DMSO; 7 组: 30% DMSO。

Group 1: fresh sperm; Group 2: 5% DMSO; Group 3: 10% DMSO; Group 4: 15% DMSO; Group 5: 20% DMSO; Group 6: 25% DMSO; Group 7: 30% DMSO.

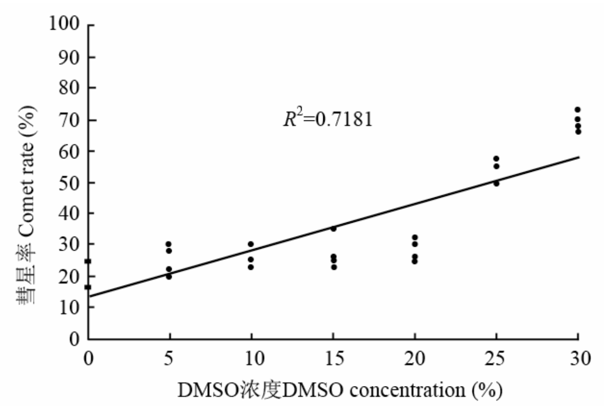


图 4　黑鲷鲜精及冻精 SCGE 检测的彗星率与 DMSO 浓度的相关性

Fig. 4　Relativity between comet rate and DMSO concentration of fresh sperm and frozen-thawed sperm

3　讨　论

本试验发现，以 Cortland 溶液为稀释液和 5%—20%的 DMSO 为抗冻剂进行超低温冻存黑鲷精子的效果较佳，冻精核的 DNA 损伤较轻；DMSO 浓度超过 20%时，黑鲷精子冻存效果明显下降，冻精核的 DNA 损伤程度明显加重。

Hong et al（1997）用 15%DMSO 及 10%DMSO+10%甘油为抗冻剂冷冻黑鲷精子，冻精激活率较高（＞85%），运动时间较长（＞15 min），冻精受精率接近 80%；Li et al（2001）以 20%DMSO 为抗冻剂，以 20℃/min 的速率降温，在液氮中保存黑鲷精子 66 d 后解冻，其复苏率达 59.81%，但未测定冻精的受精率；Jiang et al（1999）以 DMSO 为抗冻剂冷冻黑鲷精子，冻精激活率达 90%，但未检测冻精受精率。我们以 5%、10%、15%及 20% DMSO 为抗冻剂进行超低温冻存黑鲷精子，其冻精的活力、受精率与鲜精无显著差异，其中以 10% DMSO 为抗冻剂的冻存效果最佳，冻精的激活率、运动时间、寿命及受精率分别达(92.91±1.25)%、(39.90±2.70)min、(53.82±2.84)min 及(89.35±1.99)%。可见，因研究者实施的冻存条件不同，黑鲷精子冻存的效果存在差异。本试验的黑鲷冻精受精率与激活率成正比。冻精激活力与受精率的正相关性也见于对虹鳟（*Oncorhynchus mykiss*）（Lahnsteiner et al, 1996）、真鲷（*Pagrosomus major*）（Liu，2005）、大黄鱼（*Pseudosciaena croce*）（Lin & You，2002；Xiao et al，2007）及中华乌塘鳢（*Bostrichthys sinens*）（Jiang et al，2000b）等的研究报道。

DMSO是鱼类精子冻存的常用抗冻剂。已有的研究表明，以 5%—20%的DMSO为抗冻剂，在点带石斑鱼（*Epinephelus malabaricus*）（Gwo，1993）、金头鲷（*Sparus aurata*）（Fabbrocini et al，2000）、黄鳍鲷（*Acanthopagrus latus*）（Gwo，1994）、真鲷（Liu，2005）、细须石首鱼（*Micropogonias undulatus*）（Gwo et al，1991）及大菱鲆（*Scophthalmus maximus*）（Dreanno et al，1997）等海洋鱼类精液的超低温冻存中取得了较好的冻存效果。本试验表明，DMSO作为黑鲷精子超低温冻存的抗冻剂的适宜浓度也为 5%—20%。适当浓度的 DMSO 对精子冻存具有良好的保护作用，但若

DMSO浓度过高，则会对精子产生毒副作用，使精子冻存效果下降。如本试验中，当DMSO浓度为25%、30%时，冻精激活率及受精率明显下降，相同的现象也见于对细须石首鱼（Gwo et al，1991）、美洲大绵鳚（*Macrozoarces americanus*）（Yao et al，2000）、狼鲈（*Dicentrarchus labrax*）（Fauvel et al，1998）及大黄鱼（Lin & You，2002；Xiao et al，2007）等精子超低温冻存研究中。

Labbe et al（2001）以10%DMSO为抗冻剂，超低温冷冻虹鳟精子，冻精受精率及孵化率分别达（93.5±4.1）%及（96.5±5.0）%，冻精与鲜精彗星率差异不显著。Zilli et al（2003）对狼鲈精子超低温保存的研究表明，10%DMSO为抗冻剂，冻精彗星率与鲜精无明显差异。Xu et al（2005）对真鲷冻精DNA损伤的检测表明，冻精彗星率与抗冻剂DMSO的浓度成正相关，DMSO浓度在5%—25%范围内，冻精DNA的损伤状况与鲜精差异不显著，DMSO浓度为30%时，冻精DNA的损伤状况与鲜精差异显著。我们的试验结果表明，黑鲷冻精的DNA损伤程度与损伤比例随DMSO的浓度升高而增大；DMSO浓度在5%—20%内，黑鲷冻精DNA损伤状况与鲜精接近，而且冻精活力与鲜精无显著差异；DMSO浓度高于20%时，黑鲷冻精DNA损伤要比鲜精明显加重，冻精的活力明显下降。因此，为保证黑鲷冻精DNA的稳定性，宜将抗冻剂DMSO的浓度控制在5%~20%内。本试验所用的精液系采自同一批亲鱼，而且各实验组精液均采用相同的适宜的降温与复温程序，冻精组彗星率及损伤系数的差异主要是由抗冻剂DMSO浓度不同引起的。可以认为，较高浓度的抗冻剂DMSO是造成冻精核DNA损伤的主要原因。

试验过程中，对传统的SCGE方法进行了改进：①采用的玻片为普通的载玻片，透光性好，便于观察，而特制的SCGE试剂盒玻片成本偏高；②将电泳条件进行优化，确定为130 mA、15 V、60 min，在此条件下SCGE的灵敏性较高、彗星图谱清晰。SCGE试验结果采用人工指标分析与计算机图像分析相结合，人工指标分析包括彗星发生率及距离指标（头长、尾长等）的分析，易人工测量，无需复杂仪器，但较粗略；而计算机图像分析是利用分析软件进行的，可进行精细的荧光强度、尾矩及彗星距等指标测定与分析（Olive et al，1990；Kent et al，1995）。本试验使用CometScore 1.5软件对SCGE的结果进行分析，客观、精确地测定了彗星全长、尾长、彗尾DNA占总DNA的比例（DNA in tail）等参数，结合彗星发生率、DNA损伤分级计数等方法，保证了实验结果分析的准确性和可靠性。

参考文献：

Dreanno C, Suquet M, Quemener L, Cosson J, Fierville F, Normant Y, Billard R. 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa[J]. *Theriogenology*, **48**: 589-603.

Fabbrocini A, Lavadera SL, Rispoli S, Sansone G. 2000. Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) Spermatozoa [J]. *Cryobiology*, **40**: 46-53.

Fauvel C, Suquet M, Dreanno C, Zonno V, Menu B. 1998. Cropreservation of seabass (*Dicentrarchus Labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions[J]. *Aquat Living Resour*, **11**: 387-394.

Gwo JC. 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa [J]. *Theriogenology*, **39:** 1331-1324.

Gwo JC. 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa (teleost, perciformes, sparides) [J]. *Theriogenology*, **41**: 989-1004.

Gwo JC, Strawn K, Longnecker MT, Arnold CR. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa [J]. *Aquaculture*, **94**: 355-375.

Hong WS, Zhang QY, Zhou DC. 1997. Short-term cryopreservation of spermatozoa of *Sparus macrocephalus* and *Boleophthalmus pectinirostris* [J]. *Mar Sci*, **7**: 6-8.[洪万树，张其永，周东晨. 1997. 黑鲷和大弹涂鱼精液短期冷冻保存.海洋科学, **7**: 6-8.]

Jiang SG, Ou YJ, Li JE. 1999. Effects of preservation under different temperatures on biological property of black porgy (*sparus macrocephalus*) sperm [J]. *J Trop Oceanogr*, **18**(4): 81-85. [江世贵，区又君，李加儿. 1999. 不同温度保存对黑鲷精子生理特性的影响. 热带海洋, **18** (4): 81-85.]

Jiang SG, Li JE, Ou YJ, Zheng YT. 2000a. Relationships between conditions for activating spermatozoa of four sparidae fishes and the fishes' ecological habits[J]. *Acta Ecol Sin*, **20** (3): 468-473. [江世贵，李加儿，区又君，郑运通. 2000a. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系. 生态学报, **20**(3): 468-473.]

Jiang SG, Su TF, Yu DH, Chen JC, Zhou LX. 2000b. The biological characteristics of *Bostrichthys sinensis* spermatozoa and its cryopreservation[J]. *J Fish Chn*, **24**(2): 119-122. [江世贵，苏天凤，喻达辉，陈竟春，周立新. 2000b. 中华乌塘鳢精子的生物学特性及其超低温保存. 水产学报, **24** (2): 119-122.]

Kent CRH, Eady JJ, Ross GM, Steel GG. 1995. The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay [J]. *Int J Radiat Biol*, **67**(6): 655-660.

Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maisse G. 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout[J]. *Mol Reprod Dev*, **60**: 397-404.

Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner R. 1996. Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation [J]. *Prog Fish Cuhur*, **58**: 149-159.

Li C, Li J, Xue QZ. 2001. Cryopreservation of spermatozoa of black porgy [J].*Mar Sci*, **25** (11): 1-4. [李 纯，李 军，薛钦昭. 2001. 黑鲷精子

的超低温保存研究. 海洋科学, **25**(11): 1-4.]

Lin DJ, You YL. 2002. Physiological characteristics and cryopreservation of *Pseudosiaena crocea* (Richardson) sperms [J]. *J Trop Oceanogr*, **21**(4): 69-75.[林丹军, 尤永隆. 2002. 大黄鱼精子生理特性及其冷冻保存. 热带海洋学报, **21**(4): 69-75.]

Liu QH. 2005. Study on spermatozoa cryopreservation and cryodamage in red seabream (*Pagrosomus major*)[D]. Ma. D. thesis, Oean Univ Chn.[刘清华. 2005. 真鲷(*Pagrosomus major*)精液超低温保存及其低温损伤研究. 硕士毕业论文, 中国海洋大学.]

Lu HO, Zhang L, Zhang N, Tang J, Ding XP, Tang Y. 2002. Detection of DNA damage of human sperm using single cell electrophoresis [J]. *Ntl J Androl*, **8**(6): 416-418. [鲁海鸥, 张　黎, 张　宁, 汤　洁, 丁晓萍, 唐　轶. 2002. 单细胞凝胶电泳检测人精子DNA损伤. 中华男科学, **8** (6): 416-418.]

Olive PL, Banath JP, Durand RE.1990.Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet" assay[J].*Rad Res*, **122** (1): 86-94.

Wolf K. 1963. Physiological salinesfor freshwater teleosts[J]. *ProgFish-Cult*, **25**: 135-140.

Xiao ZZ, Chen XF, Ding FH, Liu QH, Xu SH, Li J. 2007. An efficient methodology of sperm cryopreservation of large yellow croaker (*Pseudosciaena croce*)[J]. *Mar Sci*, **31**(4): 1-4. [肖志忠, 陈雄芳, 丁福红, 刘清华, 徐世宏, 李　军. 2007. 大黄鱼精液的高效超低温保存. 海洋科学, **31**(4): 1-4.]

Xu DX, Shen HM, Wang JN. 2000. Detection of DNA strand breakage in human spermatozoa by use of single-cell gel electropherosis[J]. *Chn J Med Genet*, **17**(4): 281-284. [徐德祥, 沈汉民, 王俊南. 2000. 单细胞凝胶电泳用于检测人精子 DNA 链断裂. 中华医学遗传学杂志, **17**(4): 281-284.]

Xu XC, Ding FH, Li J. 2005. Cryopreservation caused sperm and damage in red sea bream *Pagrosomus major* and its detection [J]. *Oceanol Limnol Sin*, **36**(3): 221-225. [徐西长, 丁福红, 李　军. 2005. 单细胞凝胶电泳用于检测低温保存的真鲷(*Pagrosomus major*)精子 DNA 损伤. 海洋与湖沼, **36**(3): 221-225.]

Yao Z, Crim LW, Riehardson GF, Emerson CJ. 2000. Motility, fertility and u1trastruetural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation [J]. *Aquaeulture*, **181**: 361-375.

Zilli L, Schiavone R, Zonno V, Storelli C, Vilella S. 2003. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation [J]. *Cryobiology*, **47**: 227-235.

～～